生薬学講座　　卒業実験報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-115	氏　名	海道博美
所属講座	生薬学講座		
研究テーマ	昆虫薬、黒蟻（*Polyrhachis dives*)の化学・薬理学的研究(5) ―活性画分 fr.2H の分画と活性評価―		

研究概要

抗炎症・鎮痛・抗痙攣などの薬理作用が期待され、中国において様々な治療に用いられている黒蟻 *Polyrhachis dives* の EBM (Evidence-Based Medicine)としての有効利用を鑑み、その科学的薬効解析を目的として、本研究プロジェクトは平成 19 年度から開始された。*P.dives* 粉末の AcOEt 抽出物 Pd-ext.1 は炎症メディエーターのプロスタグランジン（PG）E_1 並びに E_2 で誘導されたモルモット腸管収縮を抑制することが見出され、既に一部の分画が行われた。

本卒業実験においては、その第 5 部として活性画分の一つである fr.2H より PGE_2 抑制活性を指標として活性成分の単離を試みた。

前年度の分画を参考にして、まず ODS を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより small scale (column 6)で検討した後、large scale (column 7)での分画を進め、fr.7A～fr.7F の 6 画分を得た。ODS-TLC (MeOH:H_2O=8:1)上で比較し、small scale (column 6)と large scale (column 7)で得られた同様のフラクションをまとめ、fr.7A'～fr.7F'とした。それらの画分に関し、マグヌス法によりモルモットの回腸を用いて PGE_2 誘導腸管収縮に対する抑制活性評価を行ったところ、fr.7B' (726 mg)及び fr.7C' (389 mg)に 3×10^{-4} mg/mL で強い抑制活性が認められた。fr.7B'と fr.7C'は TLC 上、共通のスポットが観察されたため、まず fr.7B'の分画を行うこととした。

活性画分 fr.7B'の分画においては ODS-TLC で分離条件を検討したが、fr.7B'の 2 つのスポットの Rf 値が非常に近いために溶出液を細かくチェックすることで分離することにした。その結果、比較的良好な分画となり、ODS-TLC (MeOH:H_2O=20:1）上、単一スポットを示した fr.10D (119 mg)並びに fr.10F (7 mg)を得た。fr.7B'の ^{1}H-及び ^{13}C-NMR により脂肪酸を主に含むと推定されたため、fr.10D を TLC 上いくつかの脂肪酸標品と比較したところ、palmitoleic acid と同様の Rf 値を示すことが明らかとなった。

fr.10D の PGE_2 抑制活性評価において、5×10^{-4} mg/mL で強い抑制活性が認められた。なお、fr.10F に関しては十分な試料量の確保ができなかったので活性評価は行わなかった。

今後は、fr.7B'と同様に 3×10^{-4} mg/mL で PGE_2 誘導腸管収縮に対する抑制活性が認められた活性画分 fr.7C'の分画の検討が必要であろう。

なお、fr.10D は ODS-TLC 上で単一スポットを示したが、本テーマ第 7 部(佐藤香織)による fr.10D の詳細な構造解析により、palmitoleic acid を主成分とし、若干の myristic acid を含むことが明らかとなった。

また、もう一つの活性画分である fr.2G からの分画と活性評価については本テーマ第 6 部(小出綾子)が担当した。

卒業実験報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-171	氏　名	小出綾子
所属講座	生薬学講座		
研究テーマ	昆虫薬、黒蟻（*Polyrhachis dives*）の化学・薬理学的研究（６） ―活性画分 fr.4B の分画と活性評価―		

研究概要

抗リウマチ、抗炎症、鎮痛作用があると言われている黒蟻の一種 *Polyrhachis dives* F.Smith の薬効解析を目標として、平成 19 年度から本研究プロジェクトが開始された。*P. dives* の AcOEt 抽出エキス（Pd-ext.1）には、抗炎症作用の指標としたプロスタグランジン（PG）E_1 及び E_2 に活性が認められ、その後の活性評価を伴った分画により、活性画分として fr.2G（4.59 g）及び fr.2H（10.1 g）が見出された。

本卒業実験においては、それを引き継ぎ、本研究テーマ第六部として、活性画分 fr.2G の PG 抑制成分を明らかにすべく実験を行った。

マグヌス法により、モルモット回腸を用いた PGE_2 誘導収縮に対する抑制活性評価において、活性を示した画分である fr.2G は先に fr.4A～4D に分画されたが、それらの全ての画分に活性は認められていない。そこで、まず活性が見られなかった結果を考察し、投与濃度が適切でなかった可能性を考え、前年度の試験よりも 2～10 倍高濃度の試料を調製し、同様に PGE_2 誘導腸管収縮抑制活性評価を行った。

その結果、活性は fr.4B（2763 mg）に 1×10^{-3} g/mL において確認され、活性は本画分に集約していると判断した。fr.4B の ODS - TLC により検討したところ、活性画分 fr.2G の主成分を含有していると考えられたため、本画分の分画をさらに進めることにした。

活性画分 fr.4B は、予備分画 column 8（306 mg）として ODS フラッシュクロマトグラフィーにより、溶出溶媒は MeOH：H_2O = 8：1、MeOH：H_2O = 15：1、Acetone：MeOH = 1：1、Acetone を順に用い溶出させることで、良好な結果を得た。

予備分画を参考に、column 9（2350 mg）として fr.4B を分画し、5 画分 fr.9A（282 mg）、9B（110 mg）、9C（1163 mg）、9D（405 mg）、9E（22 mg）を得た。fr.9A～9D について、PGE_2 誘導腸管収縮抑制活性評価を行ったところ、fr.9A,fr9.B 及び fr.9C のそれぞれ 5×10^{-4} g/mL の濃度で活性が認められた。

fr.9C は活性画分 fr.4B の主成分を含有し、しかも結晶化が可能と思われたため再結晶により精製し、結晶として 9C-c1（80 mg）を得た。9C-c1 の PGE_2 抑制活性の評価を行ったところ、1×10^{-4}g/mL において活性は認められなかった。

また、他の活性画分 fr.2H の分画は本テーマ第五部として海道博美が担当し、活性画分として fr.10D（119 mg）を得た。

なお、9C-c1 及び fr.10D の構造解析に関しては、本テーマ第七部として佐藤香織が担当した。

卒業実験報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-125	氏　名	佐藤　香織
所属講座	生薬学講座		
研究テーマ	昆虫薬、黒蟻（Polyrhachis dives）の化学・薬理学的研究（7） ―9C-c1 及び fr.10D の構造解析と活性評価―		

研究概要

本研究テーマは、抗炎症、抗リウマチ、鎮痛作用を有すると言われている黒蟻 *Polyrhachis dives* F.Smith を対象とし、その化学・薬理学的な基礎データの提供を目的として平成 19 年度に開始された。本卒業実験においては、それを継続し、研究テーマ（7）として、分画によって得られた画分のうち TLC 上で単一スポットとして認められ、比較的純粋な画分と思われた 9C–c1 及び fr.10D について含有成分の構造解析並びに関連化合物を含めた活性評価を行った。

9C-c1 の主成分は ^{1}H-NMR 及び ^{13}C-NMR において、カルボン酸、メチル基及び多くのメチレン基由来のシグナルが観察されたことより直鎖脂肪酸であると推定された。また、若干のオレフィン炭素の存在が認められたため、飽和脂肪酸中に minor 成分として不飽和脂肪酸が含有されていると考えられた。^{1}H-NMR における積分値並びに TLC におけるいくつかの脂肪酸との挙動の比較から、主成分の飽和脂肪酸は palmitic acid (C16:0)であり、少量の oleic acid (C18:1Δ^{9Z})を含有すると推定した。そこで、palmitic acid と oleic acid を 10:1 の割合で混合した試料を作成し、1H-NMR で 9C-c1 と比較したところ、よく類似していた。

最終的に 9C-c1 の GC-MS により標品の palmitic acid 及び oleic acid と保持時間並びにマススペクトルが一致したことから含有成分を同定した。

fr.10D は ^{1}H-NMR 及び ^{13}C-NMR は 9C-c1 と類似していたが、オレフィン水素並びに不飽和炭素関連のピークが大きく現れていたため、主成分は不飽和脂肪酸であると判断した。また、1H-NMR ではオレフィン由来のシグナルが重なり、^{13}C-NMR で δ 27.2ppm に cis 型二重結合炭素に結合する炭素に特徴的なシグナルが 2 本観察されたことから、cis と判断した。また TLC におけるいくつかの脂肪酸の挙動との比較から、fr.10D は palmitoleic acid (C16:1Δ^{9Z})と共に minor 成分として myristic acid (C14:0)を含有すると推定された。

最終的に fr.10D の GC-MS において、標品の palmitoleic acid 及び myristic acid と保持時間並びにマススペクトルが一致したことより、含有成分を同定した。

PG 誘導収縮抑制活性に寄与する脂肪酸の構造要因に関する知見を得るため、入手できた脂肪酸標品について活性評価を行った。炭素数 14~18 の飽和脂肪酸は 5.0 $\times 10^{-5}$ g/mL では活性は認められなかった。不飽和脂肪酸では linoleic acid (C18:2Δ^{9Z12Z})は 1.0×10^{-4}g/mL で活性が認められたが、palmitoleic acid (C16:1Δ^{9Z})よりも活性は弱いものであった。また、oleic acid (C18:1Δ^{9Z})では 1.0×10^{-3}g/mL 活性が認められなかった。これらの不飽和脂肪酸は 9 位に cis 型不飽和結合を有する点で共通していることから、9 位の不飽和結合が必ずしも活性に寄与しているとは考えがたいが、更に検討する必要がある。

卒業演習報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-014	氏　名	木下　雅博
所属講座	生薬学講座		
演習テーマ	漢方薬データベースの作成(4)　―システムの確認とマニュアル作成―		

演習概要

平成 19 年度より本講座において作成を開始した漢方薬データベースに関し、内容を確認して問題点を抽出した。見出された問題のうち、本卒業演習においては、①バックアップを行っていない、②取扱説明書がわかりにくい点について改善を行った。

＜バックアップについて＞　これまでバックアップは行われておらず、データが消えてしまった場合の対処がされていなかった。そこで、バックアップの方法を検討した結果、@wiki にバックアップデータを自動作成してくれる機能を見出したため、それを利用してデータの保存を行った。このことにより、トラブルに際し、ある程度の状態にまでデータベースを復元することが可能となった。しかし、復元方法の詳細に関しては、今後解説書を作成する必要がある。

＜取扱説明書について＞　既存の漢方薬データベース作成に関する取扱説明書がわかりにくいものであったので、新しく『データベース作成における基本操作手順書』を作成した。操作画面を画像化して示したことで、実際の画面と比較しながら操作できるようになり、わかりやすいものになったと思われる。

なお、漢方薬データベースを作成するにあたり、事前演習課題①として六病位について調べ、講座内で発表を行った。

卒業演習報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2004-076	氏　名	佐藤　淳
所属講座	生薬学講座		
演習テーマ	漢方薬データベースの作成（５） ―データベース検索おける@wiki 操作手順―		

演習概要

近年、医療現場の薬剤師も漢方薬について調剤や情報提供する機会も増え薬学生も漢方について学ぶ必要がでてきた。そこで平成１９年度から本生薬学講座において、漢方情報提供手段として漢方薬データベース作成を開始した。既に、基本システムとして@wiki を採用し構造とカテゴライズが行われた。

本演習テーマ（５）では、新たにプラグインの検討並びに設定を行った。プラグインは、小さなプログラムであり、設定することでさまざまな機能を追加することができる。@ｗｉｋｉで使用できるプラグイン数は約３５０種であるが、その中で有用と思われたいくつかのプラグインを仮設定し検討した。その結果、本データベースに採用したものは、更新日時・更新履歴、アンダーライン、水平線、検索機能、画像の挿入、リンク機能である。プラグイン設定により本データベースの操作性が向上したと思われる。さらに、今後のプラグイン設定を容易にするために、『プラグイン設定手順書』を作成した。

また、本漢方薬データベース作成における事前演習として、漢方の「気血水」という考え方並びに生薬「地黄」について調べた結果をまとめた。

卒業演習報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-098	氏　名	森田陽介
所属講座	生薬学講座		
演習テーマ	漢方薬データベースの作成（６） ―データベースのテンプレート作成―		

演習概要

生薬学講座において平成１９年度から作成を開始した漢方薬データベースは、システムとして特徴的な@wiki を用いた利便性の高いものと思われたが、いくつかの問題点が認められた。そこで、平成 20 年度 本テーマ（６）ーデータベースのテンプレート作成―として、入力記載項目の検討並びにテンプレートの作成を行った。変更点として、データベースのファイル入力のためのテンプレートにおいて、記載項目を大きく二分し、上段には西洋医学的考え方の項目、下段には漢方医学的考え方の項目を記載することにした。そして、生薬テンプレートには上段の項目として、副作用、生合成経路の項目を追加し、下段の項目として、神農本草経における上薬、中薬、下薬の分類、性味、その生薬を配合する漢方処方の項目を追加した。さらにその生薬を配合する漢方処方へのリンクを作成した。また、漢方薬テンプレートには、上段の項目として、適応症の項目を追加し、下段の項目として、六病位、八綱分類の項目を追加した。

なお、事前演習課題として陰陽論をまとめた。

卒業演習報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2005-022	氏　名	重松愛佳
所属講座	生薬学講座		
演習テーマ	漢方薬データベースの作成（７） ―医療現場での利用を想定したデータベースの試行と考察―		

演習概要

本講座において H19 年度から、薬学生並びに医療従事者を対象とした「漢方薬データベースの作成」が開始され、本年度はその改良が試みられた。

本卒業演習として、改良されたデータベースの利便性を確認するため、医療現場での利用をシミュレーションとして設定した。それによりデータベースの試行、情報解釈、その際に明らかとなった本データベースの長所、短所、改善を要する点についての考察を行った。

西洋学的・漢方学的所見からの情報を区別して入手でき、基本的注意事項から、報告件数の少ない情報まで掲載されている点で、本漢方薬データベースは、迅速かつ円滑に情報を提供できることが明らかとなった。一方、探索機能の充実、漢方医学理論、漢方専門用語集などの情報項目の追加が必要になると思われた。これらの改良を行うことで、本データベースはさらに利便性、柔軟性を備え、薬学生並びに医療従事者への情報提供に役立つと期待できる。

なお、事前演習課題として勉強会が設けられ、漢方医学総論「五行説」並びに、薬方「柴胡湯類」についての調査を行った。

卒業演習報告書（2008 年度）

学籍番号	PC2004-133	氏　名	庄司　智美
所属講座	生薬学講座		
演習テーマ	漢方薬データベースの作成(3) ―試行入力と動作確認―		

演習概要

漢方薬データーベース作成に当たり、まず本テーマ（1）として基本ベースの選定が行われ（堀田井氏担当)、@wiki を利用したツールを用いることになった。次いで、本テーマ（2）（本多氏担当）においては、データーベースの構成とカテゴライズが行われた。その結果､漢方薬 128 処方並びにその構成生薬として含まれる生薬約 300 種についての情報提供を当面の目標として設定された。本演習においては、@wiki での漢方薬データーベース編集方法の概略と試行入力並びに、動作確認を行った。なお、漢方処方名約 60 種の入力並びに生薬 8 種（益智、ヤボランジ、ヨクイニン、ラウオルフイア、竜胆、連翹、ロートコン、ロジン）の試行入力を行った。その後、動作確認により、本データーベースが問題なく機能することを確認した。